

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA
CAMPUS DE BOTUCATU

**IMUNOEXPRESSÃO DE RECEPTORES DE ESTRÓGENO E
PROGESTERONA, HER-2, P63, CK5, CATEPSINA D E PROTEÍNA
S100A4 EM CARCINOMA ESPONTÂNEO DE MAMA EM CADELAS**

MESTRANDA: FERNANDA CARMELLO FIGUEIROA

ORIENTADORA: LIVRE DOCENTE NOEME SOUSA ROCHA

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. FERNANDO SCHMITT

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP, para obtenção do título de Mestre em Patologia.

BOTUCATU - SP

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Figueiroa, Fernanda Carmello.

Imunoexpressão de receptores de estrógeno e progesterona, HER-2, P63, CK5, Catepsina D e Proteína S100A4 em carcinoma espontâneo de mama em cadelas / Fernanda Carmello Figueiroa. – Botucatu : [s.n.], 2009

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2009.

Orientador: Noeme Sousa Rocha

Co-orientador: Fernando Schmitt

Assunto CAPES: 40105008

1. Cão - Doenças 2. Mamas - Câncer

CDD 636.70896994

Palavras-chave: Cadelas; Câncer de mama; Marcadores; Subtipos de tumores de mama; Tissue microarray



Citação

*"O sucesso é construído à noite!!!
Durante o dia você faz o que todos fazem."*

Roberto Shinyashiki



Dedicatória

*A Deus, por iluminar minha vida,
guiar meus caminhos e
me dar forças pra continuar!*

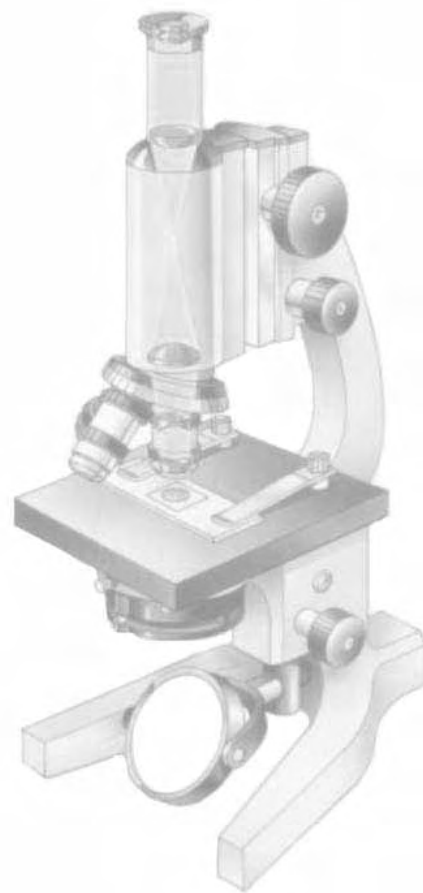
*Aos meus queridos pais, Carlos Eduardo
e Iolanda, pela dedicação e amor
incondicional, e por me ensinarem
os verdadeiros valores da vida.*

*À Beatriz, minha irmãzinha querida,
pelo apoio, pelos momentos de
descontração e por sempre
estar presente.*

*Às minhas cachorras, Tina, Cindy,
Boneca, Phoebe, Meg, Pituka e Nina
Pela companhia e por todos
os momentos de alegria*

*A todos os animais que venham a desenvolver
câncer de mama.*

*Que esse estudo guie novos caminhos e
traga melhorias no diagnóstico, prognóstico,
tratamento e na qualidade de vida!*



Agradecimentos especiais

À Professora Livre Docente Noeme Sousa Rocha, minha querida orientadora. Agradeço pela disponibilidade em me orientar, pelos ensinamentos, pela paciência, apoio e pela grande amizade.

Ao Professor Dr. Fernando Carlos Lander Schmitt, agradeço pela oportunidade de estagiar no IPATIMUP, na cidade do Porto em Portugal e assim realizar parte deste trabalho. Sou grata por todos os ensinamentos, orientações e sugestões para a realização desse estudo.

À Professora Dra. Maria Aparecida Custódio Domínguez, agradeço por todo auxílio prestado, pela grande amizade, pelas orientações e ensinamentos, fundamentais para minha formação.

À Diana Martins, meu anjo da guarda no IPATIMUP. Obrigada pela paciência, pela amizade, pelas orientações. Agradeço muito por me ensinar a técnica de Tissue Microarray e dar todas as coordenadas para desenvolvê-la brilhantemente.



Agradecimentos

Aos professores, Dr. Júlio Lopes Sequeira, Dra. Renée Laufer Amorim e Dra. Michiko Sakate por todo apoio, auxílio e incentivo.

Ao Marcos Roberto Franchi e à Celene Maria C. Gandin por me salvarem quando me auxiliaram nas imunoistoquímicas realizadas.

Ao Professor Adjunto José Eduardo Corrente, pelo auxílio prestado na análise estatística.

Ao Fábio Henrique Evangelista de Andrade, pelo auxílio na coleta e processamento das amostras.

À toda a equipe do IPATIMUP, agradeço pela acolhida, hospitalidade, confiança, ensinamentos. Vocês foram fundamentais para a realização deste estudo.

À Adelina Gama, por me acolher em Vila Real e me mostrar a rotina do Hospital Veterinário da Universidade Trás-os-Montes e Alto Douro. Agradeço por me ensinar a padronização da imunoistoquímica dos receptores de estrógeno!

Aos amigos de pós-graduação da Patologia Veterinária:

Isabelle, Luciano, Giuliana, Mariana, Marcela e Paulo Ricardo, pela amizade, auxílio, apoio, companheirismo e momentos de descontração.

Aos meus amigos: Samantha, Sandra, Flávia, Thaís, Camila, Sayuri, Marcelo (Bolinha), Rafael (Banana), Danilo, Betinho, Luís, Thiago, Ricardo, Eduardo.

*Agradeço pelo apoio, pela companhia, pelas baladas.
A vida é mais feliz com vocês ao meu lado.*

Aos meus amigos e colegas da CEF - Vila dos Lavradores, especialmente Arnaldo, Patty, Rô, Ju, Cássia, Maura, por me apoiarem, suprir minhas ausências e torcerem pela finalização desse trabalho.

A todos os proprietários que gentilmente permitiram que o tecido neoplásico retirado cirurgicamente de suas cadelas fossem estudados.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização dessa pós-graduação e desse projeto de pesquisa

A todos vocês,

Meus sinceros agradecimentos!!!

Muito Obrigada!!!



Sumário

SUMÁRIO

• REVISÃO DA LITERATURA.....	18
• REFERÊNCIAS.....	24
• ARTIGO CIENTÍFICO.....	29
➤ Resumo.....	30
➤ Abstract.....	31
➤ Introdução.....	32
➤ Objetivos.....	34
➤ Materiais e Métodos.....	35
➤ Resultados.....	41
➤ Discussão.....	48
➤ Conclusão.....	52
➤ REFERÊNCIAS.....	53
➤ Anexo 1.....	56
➤ Anexo 2.....	57



Revisão da Literatura

REVISÃO DA LITERATURA

O câncer de mama é a neoplasia mais comum na cadela e na mulher (MISDORP, 2002; PELED *et al.*, 2008). Os tumores de mama em cadelas despertam interesse especial para oncologistas médicos e veterinários devido à similaridade que apresenta com o câncer de mama na mulher (NERURKAR *et al.*, 1989; HATAKA, 2004). Várias características epidemiológicas, clínicas e biológicas são semelhantes aos da espécie humana e por isso vêm sendo utilizados como modelos para o conhecimento de alguns aspectos da carcinogênese mamária na mulher (CASSALI, 2000).

A maioria dos tumores de mama afeta cadelas com idades compreendidas entre os oito e os 10 anos, no entanto, podem surgir tumores malignos em cadelas com menos de cinco anos (BURINI, 2002). Não existe predisposição racial evidente, embora no Brasil ocorram mais freqüentemente em cadelas sem raça definida (SRD), isso se deve ao fato de haver o predomínio de cães mestiços no país (FERREIRA & CASSALI, 2003). O tamanho dos tumores pode variar, desde pequenos nódulos com 0,5 cm de diâmetro até tumores com mais de 15 cm no seu maior diâmetro. Em alguns animais o tumor pode apresentar ulceração cutânea ou sinais evidentes de inflamação. Apesar da sua alta taxa de ocorrência estas neoplasias apresentam um desafio terapêutico para o clínico, pois exibem variações consideráveis na sua aparência clínica e histológica (LOAR, 1992).

Para Misdorp (2002) o exame histopatológico é o melhor método de diagnóstico dos tumores de mama em cadelas, pois inclui o tipo de tumor e fornece informações acerca do prognóstico. Segundo Philibert *et al.* (2003), a análise das células tumorais auxilia muito para a determinação do comportamento biológico do tumor. A nomenclatura internacional para os tumores mamários da cadela é conflitante, pois existem várias propostas de classificação. Estas se baseiam principalmente no padrão morfológico, devido à escassez de informações

baseadas em outros parâmetros (DESTEXHE *et al.*, 1993) e estão entre os tópicos mais controversos na oncologia veterinária (LOAR, 1992). A Organização Mundial da Saúde realizou a classificação de tumores mamários de cães e gatos, associando histogênese, descrição da expressão morfológica e fatores prognósticos (MISDORP *et al.*, 1999).

Assim como o câncer de mama na mulher, os tumores mamários nas cadelas representam um grupo heterogêneo de tumores com diversidade no comportamento biológico, evolução e resposta à terapia (MATOS *et al.*, 2005). Recente estudo do perfil de microarranjo de cDNA em tumores mamário humanos tem identificado distintos subtipos de carcinomas que são associados com diferentes evoluções clínicas (SORLIE *et al.*, 2001; SORLIE *et al.*, 2003). Os marcadores moleculares são úteis na caracterização de células nem sempre vistas na histopatologia, dando ao clínico uma nova perspectiva no tratamento. Eles podem evidenciar tanto fatores de proliferação celular quanto a apoptose celular.

Há uma busca contínua para a elucidação dos mecanismos envolvidos no processo de desenvolvimento de tumores mamários na cadela, e também para a identificação de fatores prognósticos e possíveis alvos terapêuticos.

Na medicina humana, ferramentas genômicas, como o cDNA microarray, possuem grande potencial para decifrar os padrões moleculares dos tumores e para identificar novos e melhores marcadores clínicos (SIMON *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2004). Para Vieira *et al.* (2008), o exame anatomopatológico é o ponto de partida para o estudo molecular, pois, por meio do material recebido, pode-se determinar, por métodos imunoistoquímicos, o perfil de expressão, que inclui receptores hormonais e padrões de expressão protéica. Assim, além de se determinar a classificação morfológica, pode-se adicionar ao relatório anatomopatológico o perfil molecular do carcinoma de mama da mulher.

A presença de receptores hormonais específicos nos tumores mamários de cadelas foi demonstrada em alguns estudos (de LAS MULAS *et al.*, 2004). Trabalhos utilizando técnicas

de radioimunoensaios constataram que cerca de 40 a 60% das neoplasias malignas de mama na mulher possuem receptores para estrógeno (RE) ou progesterona (RP) (PINOTTI, 1991). Mulheres com tumor de mama que expresse receptores de estrógeno têm um elevado índice de sobrevida e uma melhor resposta a tratamentos hormonais (COCKER *et al.*, 1969; PICHON *et al.*, 1980; DUNNWARD *et al.*, 2007). Nas cadelas, a expressão de RE é maior em tumores benignos do que em malignos, além de ser maior em tumores complexos e mistos do que quando comparado aos subtipos simples (de LAS MULAS *et al.*, 2004).

O proto-oncogene c-erbB-2 codifica uma glicoproteína transmembranar (HER-2) com atividade de tirosina quinase, a qual pertence à família dos receptores de fator de crescimento epidérmico humano (BARGMAN *et al.*, 1986). Desde o seu relato inicial por Slamon *et al.* 1987, foi demonstrado uma associação entre a amplificação desse gene e um prognóstico pobre no câncer de mama na mulher, especialmente casos com metástase para linfonodo e/ou doença metastática ou recorrente (TSUDA, 2006; ELLSWORTH, 2008). Muitos outros estudos foram conduzidos e a super-expressão foi detectada em 10 a 20 % dos carcinomas mamários invasivos da mulher (TSUDA, 2006).

A p63, caracterizada como um homólogo da p53 (YANG *et al.*, 1998), é necessária para a manutenção das células de reserva (stem cell) da população epitelial, e é expressa nas células basais de muitos tipos de epitélio estratificado (KAELIN *et al.*, 1999; LITTLE *et al.*, 2002; PELLEGRINI *et al.*, 2001; YANG *et al.*, 2000), e nas células mioepiteliais da mama humana (BARBARESCHI *et al.*, 2001), sendo considerada um possível marcador para as células de reserva (SIGNORETTI *et al.*, 2000; RIBEIRO-SILVA *et al.*, 2003). A inativação da p63 na linha germinativa sugere que esta proteína é necessária para o desenvolvimento de certos tecidos, como a glândula mamária (de LAURENZI *et al.*, 2000; MILLS *et al.*, 1999; YANG *et al.*, 1999). Em tumores mamários malignos, a imunoexpressão da p63 revela um fenótipo mioepitelial nem sempre identificado pela histopatologia rotineira assim como em

relatos prévios usando diferentes marcadores mioepiteliais (DESTEXHE *et al.* e GRIFFEY *et al.*, 1993). A p63 também é expressa em tumores de mama com diferenciação escamosa (RAMALHO *et al.*, 2006) e em carcinomas escamosos (epidermóides) em diferentes localizações anatômicas. Borba (2008) concluiu que a p63 se mostrou altamente expressa nos carcinomas epidermóides da laringe, mas que a sua hipoexpressão foi preditiva de um pior prognóstico dos pacientes. O p63 encontra-se super-expresso no carcinoma epidermóide do esôfago, mas não nos adenocarcinomas colorretal e esofágico, sugerindo que o p63 possa contribuir para a carcinogênese dos tumores escamosos (GLICKMAN *et al.*, 2001). Além disso, verificou-se correlação entre expressão do p63 e mutação no p53 em neoplasias avançadas e displasias de alto grau esofágicas (HALL *et al.*, 2001).

As células mioepiteliais expressam citoqueratinas (CK) específicas de células basais, como a CK5 (constituintes do citoesqueleto das células) e sua localização é nas camadas basal e parabasal (PEROU *et al.*, 2000). Estas células foram interpretadas no começo como sendo apenas células mioepiteliais, mais tarde foi proposto que elas podem representar células progenitoras na mama da mulher (BÖCKER *et al.*, 1993). Mais recentemente foi evidenciado que elas têm a propriedade de se diferenciar em células glandulares e mioepiteliais (BÖCKER *et al.*, 2002a). A positividade para CK5 em carcinomas mamários na mulher correlaciona-se com indicadores de mau prognóstico, incluindo idade precoce, alto grau histológico, linfonodos positivos, estágio patológico avançado e negatividade para receptores hormonais (VALE, 2006).

A catepsina D é uma enzima lisossomal com síntese induzida pelos estrógenos, geralmente observada em tumores com grande potencial metastático. Os níveis de catepsina D são correlacionados com a sobrevida livre de doença e com a sobrevida global, sendo um fator de prognóstico adverso, mesmo em casos sem comprometimento linfonodal (RICCI & GIRIBELA, 2004).

A proteína S100A4 pertence à família das proteínas dependentes do cálcio, cuja expressão é elevada em inúmeras condições patológicas. Além disso, já está bem documentado que a S100A4 é expressa em células neoplásicas malignas e contribui para a motilidade das células tumorais e conseqüente progressão metastática, entretanto esse mecanismo ainda precisa ser elucidado (TARABYKINA, 2007). Cho *et al.* (2003), relataram que a super-expressão da proteína S100A4 está intimamente relacionada com muitas funções que colaboram para a agressividade do tumor, como as metástases para linfonodos.

Com a finalidade de identificar as alterações genéticas da carcinogênese pode-se caracterizar as expressões de proteínas por meio de marcação imunistoquímica e análises de DNA e RNA. Desse modo, a utilização da técnica de *Tissue Microarray* (TMA) permite analisar tecidos com técnicas *in situ*, como a imunistoquímica (IHC), a hibridização do RNA *in situ* e a hibridização fluorescente *in situ* (BUBENDORF, 2001a). Esta técnica foi descrita pela primeira vez por Kononen *et al.* em 1998 e consiste em relocar tecidos incluídos em parafina de histologia convencional de tal maneira que dezenas a centenas de tecidos possam ser colocados em um bloco receptor e assim serem examinados e comparados numa mesma lâmina histológica. Em vista disso, um número maior de amostras pode ser analisado ao mesmo tempo, tornando os estudos mais eficientes e evitando desperdício de materiais e reagentes, portanto é economicamente vantajoso, além de proporcionar um melhor entendimento molecular dos tumores e identificar novos marcadores prognósticos ou alvos terapêuticos (BUBENDORF, 2001b).

Recentes estudos do perfil da expressão gênica em tumores de mama humanos identificaram distintos subtipos moleculares de carcinomas da mama, os quais diferem em sua patobiologia e evolução clínica (PEROU *et al.* 2000; SORLIE *et al.* 2001; SORLIE *et al.* 2003). Sorlie *et al.* (2003) analisaram o perfil de expressão de 115 amostras de tumores de mama esporádicos e os categorizaram em cinco grupos principais: Luminal A, Luminal B,

Super-expressão de HER-2, Basal e tecido mamário normal. Os subtipos, Luminal A e B baseiam-se na expressão de receptores de estrógeno, enquanto o subtipo Basal é caracterizado pela ausência de receptores hormonais e presença de expressão de marcadores de células basais (BIRNBAUM *et al.*, 2004; NIELSEN *et al.*, 2004).

O painel imunoistoquímico para caracterização dos tumores de mama na mulher já está bem estabelecido e é utilizado na rotina dos laboratórios de Patologia Humana para orientar o tratamento clínico das pacientes. Em Medicina Veterinária ainda há carência de estudos correlacionando os principais marcadores para definir um painel eficiente na identificação do prognóstico, além de sugerir possíveis alvos terapêuticos. A partir disso, a motivação desse estudo está em testar o painel imunoistoquímico utilizado em Medicina Humana e assim caracterizar o câncer de mama em cadelas a partir desses marcadores, proporcionando um melhor diagnóstico, com indicação do prognóstico e tratamento em Medicina Veterinária.

REFERÊNCIAS

BARBARESCHI, M.; PECCIARINI, L.; CANGI, M.G.; MACRI, E.; RIZZO, A.; VIALE, G., *et al.* p63, a p53 homologue, is a selective nuclear marker of myoepithelial cells of the human breast. *Am J Surg Pathol*, 2001; 25: 1054-1060.

BARGMAN, C.I.; HUNG, M.C.; WEINBERG, R.A. The *neu* oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature*, 1986; 319: 226-230.

BIRNBAU, M. D., BERTUCCI, F., GINESTIER, C., TAGETT, R., JACQUEMIER, J., CHARAFE-JAUFFRET, E. Basal and luminal breast cancers: basic or luminous? *Int J Oncol*, 2004; 25:249–258.

BÖCKER, W., MOLL, R., POREMBA, C. Common adult stem cells in the human breast give rise to glandular and myoepithelial cell lineages: a new cell biological concept. *Lab Invest*, 2002a; 82: 737-745.

BÖCKER, W., BIER, B., LUDWIG, A. Benign proliferative lesions and *in situ* carcinoma of the breast: new immunohistological findings and their biological implications. *Eur J Cancer Prev*, 1993; 2: 41–49.

BORBA M A M Análise da expressão imunoistoquímica da p63 e de seu valor prognóstico em carcinomas epidermóides da laringe [Tese]. São Paulo. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2008.

BUBENDORF, L. High-Throughput Microarray Technologies: From Genomics to Clinics. *Eur Urol* 2001b; 40: 231-238.

BUBENDORF, L; NOCITO, A.; MOCH, H.; SAUTER, G. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *J Pathol* 2001a; 195: 72–79.

BURINI, C.H.P. Caracterização clínica, citopatológica e bioquímica do câncer mamário de cadelas sem raça definida. [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2002.

CASSALI, G.D. Estudo morfológico, imunoistoquímico e citométrico de tumores mamários da cadela – aspectos comparativos com neoplasias da mama humana. [tese]. Belo Horizonte: Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais; 2000.

CHO YG, NAM SW, KIM TY, KIM YS, KIM CJ, PARK JY, *et at.* Overexpression of S100A4 is closely related to the aggressiveness of gastric cancer. *APMIS*, 2003, 111:539-545.

COCKER, T.; GEORGE, D.; SHIELDS, R. Estrogen receptors and prognosis in early breast cancer. *Lancet*, 1969; 1: 995-997.

DE LAS MULAS, J.M.; ORDÁS, J.; MILLÁN, M.Y.; CHACÓN, F.; De LARA, M.; De LOS MONTEROS, A.E., *et al.*, A. Immunohistochemical expression of estrogen receptor β in normal and tumoral canine mammary glands. *Vet Pathol*, 2004; 41: 269-272.

-
- DE LAURENZI, V.; MELINO, G. Evolution of functions within the p53/p63/p73. *Ann N Y Acad Sci*, 2000; 926: 90-100.
- DESTEXHE, E.; LESPAGNARD, L.; DEGEYTER, M.; HEYMANN, R.; COIGNOUL, F. Immunohistochemical identification of myoepithelial, epithelial and connective tissue cell in canine mammary tumors. *Vet Pathol*, 1993; 30: 146-154.
- DUNNWARD, L.K.; ROSSING, M.A.; LI, C. I. Hormone Receptor Status, Tumor Characteristics, and Prognosis: A Prospective Cohort of Breast Cancer Patients. *Breast Cancer Res.* 2007; 9:(1).
- ELLSWORTH, R. E.; ELLSWORTH, D. L.; PATNEY, H. L.; DEYARMIN, B.; LOVE, B.; HOOKE, J.A.; SHRIVER, C.D. Amplification of HER2 is a marker for global genomic instability. *BMC Cancer* 2008, 8:297.
- FERREIRA, E., CASSALI, G.D. Levantamento dos tumores mamários em cadelas no Hospital Veterinário da EV/UFMG. In: XI Encontro Nacional de Patologia Veterinária – Botucatu – SP, 2003. Anais, p.258.
- GLICKMAN, J.N. *et al.* Expression of p53-related protein p63 in the gastrointestinal tract and in esophageal metaplastic and neoplastic disorders. *Hum. Pathol.* 2001, 32: 1157-65.
- GRIFFEY, S.M.; MADEWELL, B.R.; DAIRKEE, S.H.; HUNT, J.E.; NAYDAN, D.K.; HIGGINS, R.J. Immunohistochemical reactivity of basal and luminal epithelium-specific cytokeratin antibodies within normal and neoplastic canine mammary glands. *Vet Pathol*, 1993; 30: 155-161.
- HALL, P.A. *et al.* Expression of the p53 homologue p63alpha and DeltaNp63alpha in the neoplastic sequence of Barrett's oesophagus: correlation with morphology and p53 protein. *Gut*, 2001, 49: 618-23.
- HATAKA, A. Citologia aspirativa por agulha fina e histopatologia: valor e significado ara diagnóstico e prognóstico do câncer de mama em cadelas. [tese] Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2004.
- KAELIN, W.G.J. The emerging p53 gene family. *J Natl Cancer Inst*, 1999; 91:594-598.
- KONONEN J, BUBENDORF L, KALLIONIEMI A, BARLUND M, SCHRAML P, 25. LEIGHTON S, *et al.* Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling tumor of specimens. *Nature*, 1998;4(7):844-7.
- LITTLE, N.A.; JOCHEMSEN, A.G. p63. *Int J Biochem Cell Biol*, 2002; 34: 6-9.
- LOAR, A.S. Tumores do sistema genital e glândulas mamárias. In: ETTINGER, S.J. *Tratado de Medicina Interna Veterinária*. 3.ed. v.4. São Paulo: Ed. Manole. 1992. Cap 12, p. 1894-1906.
-

-
- MATOS, I.; DUFLOTH, R.; ALVARENGA, M.; ZEFERINO, L.C.; SCHMITT, F. p63, cytokeratin 5, and P-cadherin: three molecular markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas. *Virchows Arch.* 2005; 447: n 4, 688-694.
- MILLS, A.A.; ZHENG, B.; WANG, X.J.; VOGEL, H.; ROOP, D.R.; BRADLEY, A. p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature*, 1999; 398: 708-713.
- MISDORP, W. Tumors of the mammary gland. In: MEUTEN, D.J. Tumors in domestic animals, 4.ed. Ames: Iowa State Press, 2002. p. 575-606.
- MISDORP, W.; ELSE, R.W.; HELLMÉN, E.; LIPSCOMB, T.P.; Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. 2.ed. v.7. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1999.
- NERURKAR, V.R.; CHITALE, A.R.; JALNAPURKAR, B.V.; NAIK, S.N.; LALITHA, V.S. Comparative pathology of canine mammary tumors. *J Comp Pathol*, 1989; 101: 389-397.
- NIELSEN TO, HSU FD, JENSEN K, CHEANG M, KARACA G, HU Z, *et al.*, Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004; 10:5367–5374.
- PELED R, CARMIL D, SIBONI-SAMOCHA O, SHOHAM-VARDI I. Breast cancer, psychological distress and life events among young women. *BMC Cancer.* 2008; 8:245.
- PELLEGRINI, G.; DELLAMBRA, E.; GOLISANO, O.; MARTINELLI, E.; FANTOZZI, I.; BONDANZA, S.; PONZIN, D.; MCKEON, F.; DE LUCA; M. p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001; 98:3156-3161.
- PEROU CM, SORLIE T, EISEN MB, VAN DE RIJN M, JEFFREY SS, REES CA *et al*, Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000; 406:747–752.
- PHILIBERT, J.C.; SNYDER, P.W.; GLICKMAN, N. ; GLICKMAN, L.T.; KNAPP, D.W.; WATERS, D.J. Influence of host factors on survival in dogs with malignant mammary gland tumors. *J Vet Int Med*, 2003; 17: 102-106.
- PICHON, M.F.; POLLUD, C.; BRUNET, M. Relationship of presence of progesterone receptor to prognosis in early breast cancer. *Cancer Res*, 1980; 40:3357-3363.
- PINOTTI, J.A. Métodos diagnósticos em mastologia – Exame clínico. *Compêndio de mastologia.* São Paulo: ed. Manole, cap. 3, p. 21-35, 1991.
- RICCI, M. D.; GIRIBELA, A.H.G. Fatores prognósticos do câncer de mama. *Caderno Científico - Revista da Sogesp – Julho/Agosto 2004 – Ed 53 – Ano VII*
- SANTOS PM, TEIXEIRA MC, SÁ-CORREA I. A análise proteômica quantitativa na revelação de mecanismos de resposta a stresse químico em microrganismos. *Lisboa: Boletim de Biotecnologia*; 2004.
-

-
- SIGNORETTI, S.; WALTREGNY, D.; DILKS, J.; ISAAC, B.; LIN, D.; GARRAWAY, L.; YANG, A.; MONTIRONI, R.; MCKEON, F.; LODA, M. p63 is a prostate basal cell marker and is required for prostate development. *Am J Pathol*, 2000; 157: 1764-1775.
- SIMON R, MIRLACHER M, SAUTER G. Tissue microarrays in cancer diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn* 2003;3(4):421-30.
- SLAMON, D.J.; CLARK, G.M.; WONG, S.G.; LEVIN, W.J.; ULRICH, A.; MCGUIRE, W.L. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the Her-2 *neu* oncogene. *Science*, 1987; 253: 177-182.
- SORLIE, T.; PEROU, C.M.; TIBSHIRANI, R.; AAS, T.; GEISLER, S.; JOHNSEN, H., *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001; 98:10859–10874.
- SORLIE, T.; TIBSHIRANI, R.; PARKER, J.; HASTIE, T.; MARRON, J.S.; NOBEL, A., *et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003; 100:8418–8423.
- TARABYKINA, S.; GRIFFITHS, T.R.; TULCHINSKY, E.; MELLON, J.K.; BRONSTEIN, I.B.; KRIAJEVSKA, M. Metastasis-associated protein S100A4: spotlight on its role in cell migration. *Curr Cancer Drug Targets*. 2007; 7(3): 217-28.
- TSUDA, H. HER-2 (c-erbB-2) Test Update: Present Status and Problems. *Breast Cancer*, 2006; 13(3): 236-248.
- VALE, F. R. Fatores reguladores da angiogênese e infiltração tumoral nos carcinomas mamários positivos para a citoqueratina 5. [dissertação]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP); 2006.
- VIEIRA D S C, DUFLOTH R M, SCHMITT F C L, ZEFERINO L C: Carcinoma de mama:novos conceitos na classificação *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2008; 30(1):42-7
- YANG, A.; KAGHAD, M.; WANG, Y.; GILLET, E.; FLEMING, M.D.; DOTSCHE, V., *et al.* p63, a p53 homolog at 3q27–29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing and dominant-negative activities. *Mol Cells*, 1998; 2: 305-316.
- YANG, A.; MCKEON, F.: p63 and p73: p53 mimics, menaces and more. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000; 1: 194-207.
- YANG, A.; SCHWEITZER, R.; SUN, D.; KAGHAD, M.; WALKER, N.; BRONSON, R.T., *et al.* p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature*, 1999; 398: 714-718.
-



Artigo Científico

*Imunoexpressão de Receptores de Estrógeno e
Progesterona, HER-2, p63, CK5,
Catepsina D e proteína S100A4 em
Carcinoma Espontâneo de Mama em cadelas*

Autores:

Fernanda Carmello Figueiroa¹

Maria Aparecida Custódio Domingues¹

Diana Martins²

Fernando Carlos Lander Schmitt^{2,3}

Noeme Sousa Rocha¹

Instituição:

¹Faculdade de Medicina de Botucatu – Universidade Estadual Paulista (Unesp) - Botucatu, SP, Brasil.

²Instituto de Patologia e Imunologia Molecular do Porto (IPATIMUP), Porto, Portugal.

³Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Portugal.

Correspondência:

Fernanda Carmello Figueiroa

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP - Botucatu

Departamento de Clínica Veterinária – Serviço de Patologia Animal

Rubião Junior, s/n - CEP 18618-970,

Botucatu, São Paulo, Brasil

Telefone/Fax: +55 14 3811-6293

E-mail: rochanoeme@fmvz.unesp.br

RESUMO

Por ser a maior causa de morte entre as fêmeas caninas, o câncer de mama desperta o interesse da comunidade científica, pois sua apresentação e evolução clínica são muito semelhantes aos casos de câncer de mama na mulher. No intuito de permitir a continuação dos estudos comparativos entre os tumores de cadelas e os das mulheres é fundamental a padronização da classificação histopatológica e imunohistoquímica. Por meio da técnica de *Tissue microarray* foi possível concentrar um grande número de amostras e compará-las numa mesma lâmina, permitindo que uma casuística maior pudesse ser analisada, evitando desperdícios de materiais e reagentes. A partir dos resultados da imunohistoquímica foi possível a reclassificação dos tumores de mama da cadela em Luminal A (RE+ e HER-2-) (36,36%), Luminal B (RE+ e HER-2 +) (9,09%), Basal (RE-, HER-2 - e p63 e/ou CK5 +) (37,88%) e Super-expressão de HER-2 (RE- e HER-2 +) (12,12%) assim como classificados em Medicina Humana. Além disso, foi realizada a marcação para a Catepsina D e proteína S100A4, para demonstrar o potencial metastático desses tumores. Os resultados permitem concluir que é possível a reclassificação dos carcinomas de mama em cadela assim como os tumores de mama em mulheres, promovendo um melhor entendimento das características moleculares por meio das imunorexpressões de proteínas. A Catepsina D e a proteína S100A4 se mostraram importantes na caracterização do potencial metastático, contudo novos estudos devem ser realizados para confirmar o papel desses marcadores nos carcinomas de mama metastáticos de cadelas e das mulheres.

Palavras-chave: Cadelas; Câncer de mama; Marcadores; Subtipos de tumores de mama; Tissue microarray

ABSTRACT

For being the biggest cause of death between the canine females, breast cancer arises the interest of the scientific community, therefore its presentation and clinical outcome are very similar to the cases of breast cancer in the woman. In intention to allow the following of comparative studies between the tumors of dogs and of the women the standardization of the histopathological and immunohistochemical classification is needed. By the technique of Tissue microArray it was possible to concentrate a great number of samples and to compare them in one same slide, allowing that a bigger casuistry could be analyzed, preventing the waste of materials and reagents. From the results of the immunohistochemistry the reclassification of the breast tumors of the dog was possible. They're reclassified in Luminal A (RE+ and HER-2-) 36.36%), Luminal B (RE+ and HER-2 +) (9.09%), Basal (RE-, HER-2 - and p63 and/or CK5 +) (37.88%) and HER-2 Super-expression (RE- and HER-2 +) (12.12%) as well as classification in Medicine Human. Moreover, it was carried through the marking for Cathepsin D and protein S100A4, to demonstrate the metastatic potential of these tumors. The results allow concluding that the reclassification of breast carcinomas in dog as well as the breast tumors in women is possible, promoting a better agreement of the molecular characteristics by means of the immunoexpression of proteins. Cathepsin D and protein S100A4 had shown important in the characterization of the metastatic potential. However more studies must be carried through to confirm the paper of these markers in the metastatic breast carcinomas of dogs and of women.

Key-words: Bitches; Breast cancer; Markers; Subtypes of breast tumors; Tissue microArray

INTRODUÇÃO

O câncer de mama é a neoplasia mais comum na cadela e na mulher (MISDORP, 2002; PELED *et al.*, 2008). Nas cadelas despertam interesse especial para oncologistas médicos e veterinários devido à similaridade que apresenta com o câncer de mama na mulher (NERURKAR *et al.*, 1989; HATAKA, 2004). Várias características epidemiológicas, clínicas e biológicas são semelhantes aos da espécie humana e por isso vêm sendo utilizados como modelos para o conhecimento de alguns aspectos da carcinogênese mamária na mulher (CASSALI, 2000).

Para Misdorp (2002) o exame histopatológico é o melhor método de diagnóstico dos tumores de mama em cadelas, pois inclui o tipo de tumor e fornece informações acerca do prognóstico. A análise das células tumorais auxilia muito para a determinação do comportamento biológico do tumor (PHILIBERT *et al.*, 2003). Assim como o câncer de mama na mulher, os tumores mamários nas cadelas representam um grupo heterogêneo de tumores com diversidade no comportamento biológico, evolução e resposta à terapia (MATOS *et al.*, 2005). A Organização Mundial da Saúde realizou a classificação de tumores mamários de cães e gatos, associando histogênese, descrição da expressão morfológica e fatores prognósticos (MISDORP *et al.*, 1999).

Na literatura recente há um aumento no número de investigações sobre marcadores prognósticos no câncer de mama de cadelas (ZAIDAN DAGLI, 2008), incluindo os marcadores de proliferação (MATOS *et al.*, 2006) receptores hormonais (DE LAS MULAS *et al.*, 2005), p53 e receptor do fator de crescimento epidérmico humano (HER-2) (DE LAS MULAS *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2004), entre outros. Com eventos celulares distintos envolvidos no processo de crescimento celular, diferenciação, proliferação, invasão e

metástases (BECKMANN *et al.*, 1997), a investigação de alterações moleculares múltiplas assumem um papel importante na pesquisa desses tumores.

Para Vieira *et al.*(2008), o exame anatomopatológico é o ponto de partida para o estudo molecular, pois, por meio do material recebido, pode-se determinar, por métodos imunistoquímicos, o perfil de expressão, que inclui receptores hormonais e padrões de expressão protéica. Assim, além de se determinar a classificação morfológica, pode-se adicionar ao relatório anatomopatológico o perfil molecular do carcinoma de mama da mulher.

Recentes estudos do perfil da expressão gênica em tumores de mama humanos identificaram distintos subtipos moleculares de carcinomas da mama, os quais diferem em sua patobiologia e evolução clínica (PEROU *et al.* 2000; SORLIE *et al.*2001; SORLIE *et al.*2003). Sorlie *et al.* (2003) analisaram o perfil de expressão de 115 amostras de tumores de mama esporádicos e os categorizaram em cinco grupos principais: Luminal A, Luminal B, Super-expressão de HER-2, Basal e tecido mamário normal. Os subtipos, Luminal A e B baseiam-se na expressão de receptores de estrógeno, enquanto o subtipo Basal é caracterizado pela ausência de receptores hormonais e presença de expressão de marcadores de células basais (BIRNBAUM *et al.*, 2004; NIELSEN *et al.*, 2004).

Dessa forma, a padronização da nomenclatura desses tumores é de suma importância para que as pesquisas em patologia comparada possam continuar, trazendo enormes benefícios tanto para a mulher como para a cadela.

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi analisar a imunexpressão dos marcadores de receptores de estrógeno e progesterona, HER-2, p63, CK5, Catepsina D e proteína S100A4 em carcinoma espontâneo de mama em cadelas pela técnica de imunohistoquímica em lâminas confeccionadas pelo *Tissue microarray* e correlacionar estes com a morfologia, classificando os subtipos de tumores.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Unesp, campus de Botucatu, sob o protocolo nº 233/2008 (anexo I). A inclusão dos animais foi condicionada ao consentimento por escrito dos proprietários (anexo II).

Os cães doadores das amostras foram atendidos no setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da FMVZ – UNESP – Botucatu e as amostras processadas no Serviço de Patologia da mesma Instituição. Foram utilizados blocos histológicos de 66 tumores de mama de cadelas e divididos em dois grupos de acordo com o diagnóstico histopatológico: carcinoma simples e carcinoma complexo.

A seleção do tecido neoplásico foi feita no Serviço de Patologia da FMVZ - UNESP – Botucatu/SP. A técnica de *Tissue Microarray* foi realizada no Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP), na cidade do Porto em Portugal. Parte da imunistoquímica foi realizada no IPATIMUP (RP, RE, HER-2, p63 e CK5) e a finalização das marcações (Catepsina D e proteína S100A4) foi realizada no Laboratório de Imunoistoquímica do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Exame Histopatológico

Após fixação em formalina a 10% tamponada por 48 horas e inclusão das amostras em parafina, foram obtidos cortes de 4µm de espessura e utilizada coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) para avaliação da qualidade da lâmina, classificação da neoplasia e escolha dos locais para a coleta dos cilindros para o *Tissue Microarray*. A classificação da neoplasia foi feita segundo Misdorp *et al.*, (1999), de acordo com a composição celular. Quando a

neoplasia era composta por um tipo celular (epitelial secretora) foi classificada em carcinoma simples; quando era composta por mais de um tipo celular (epitelial secretora e mioepitelial), em carcinoma complexo.

Tissue Microarray

Áreas representativas das neoplasias foram selecionadas a partir de cortes corados com HE e as áreas de interesse, marcadas nas lâminas e identificadas nos blocos doadores (figura 1A), foram retiradas (figura 1B) e transferidas para os blocos receptores. Para cada caso foram retirados dois cilindros de 2mm de diâmetro de duas áreas distintas do tumor. Em cada bloco de TMA foram incluídas também amostras de tecido de mama não neoplásico como controle e uma amostra de fígado normal para orientação do bloco. Para a construção dos TMAs foi utilizado o *Tissue MicroArray builder 20010.2*, Histopathology Ltd, Hungary (Figura 1C). Após a construção, cortes de 3µm foram cortados e aderidos a lâminas histológicas de polisina (Polysine™, Menzel-Glaser® Germany). Um corte de cada bloco receptor foi corado em HE e revisado para confirmar a presença de áreas morfológicas representativas das lesões originais.

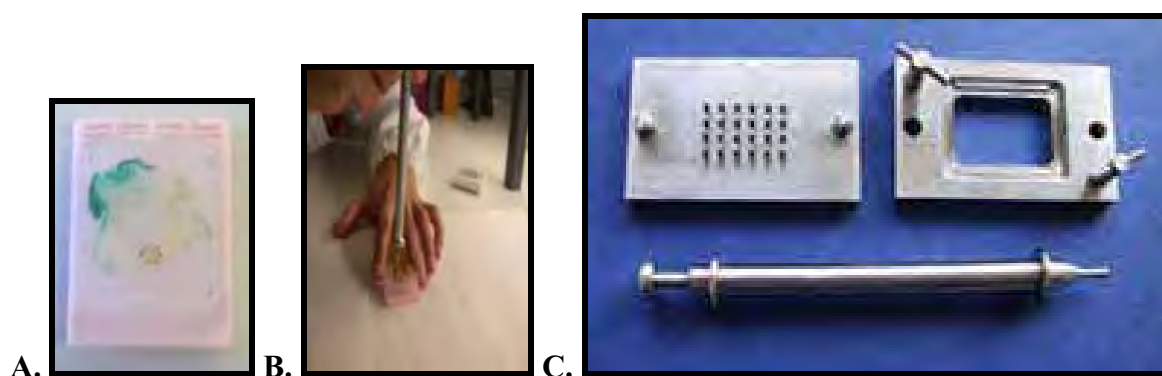


Figura 1) **A.** Marcação da área de interesse no bloco doador. **B.** Coleta dos cilindros do bloco doador. **C.** *Tissue MicroArray builder 20010.2*, Histopathology Ltd, Hungary - Instrumento constituído pelo molde do bloco receptor e pela “caneta extratora”. Fotos cedidas por Diana Martins (IPATIMUP).

Imunoistoquímica

Utilizou-se a técnica da estreptoavidina-biotina-peroxidase. A recuperação antigênica foi feita em banho-maria a 98°C durante 30 minutos para os marcadores: RP, HER-2, p63 e CK5, e o tempo de incubação variou de 30 a 60 minutos. A recuperação antigênica do marcador RE foi realizada em microondas. Após a incubação por 120 minutos em temperatura ambiente foi utilizado revelação com polímero (Novocastra), de acordo com as instruções do fabricante. Para a Catepsina D não há necessidade de recuperação antigênica, portanto as lâminas foram diretamente para a incubação por 30 minutos em temperatura ambiente. A recuperação antigênica da proteína S100A4 foi realizada em microondas e o tempo de incubação foi de 30 minutos em temperatura ambiente. A contra-coloração foi feita com Hematoxilina de Mayer (Merck) em todas as imunomarcações. Os dados dos anticorpos estão descritos na tabela 1.

Tabela 1: Anticorpos (Ac) utilizados nas marcações imunoistoquímicas.

Marcadores	Clone	Ac	Fabricante	Incubação (min)	Diluição
RP	SP2	Rmab	Neomarkers, USA	30	1:300
RE	LH2	Mmab	Novocastra, UK	120	1:40
HER-2	SP3	Rmab	Neomarkers, USA	30	1:80
p63	4A4	Mmab	Neomarkers, USA	60	1:150
CK5	XM26	Mmab	Neomarkers, USA	60	1:50
Catepsina D	A0561	Rpab	Dako, USA	30	1:300
S100A4	ab27957	Rpab	Abcam, USA	30	1:1.200

Rmab: Ac monoclonal de coelho; Mmab: Ac monoclonal de rato; Rpab: Ac policlonal de coelho

Leitura das Lâminas

A leitura das lâminas foi feita de acordo com o mapeamento prévio dos TMAs e para cada marcador foi utilizado uma graduação semi-quantitativa para avaliar os resultados da imunohistoquímica. Foi atribuído negativo (-) quando não havia marcação ou esta era em menos de 10% das células neoplásicas e a identificação da positividade variou em cada marcador como segue:

- RP: considerado positivo quando houve marcação nuclear em mais de 10% das células neoplásicas;
 - RE: considerado positivo quando houve marcação nuclear em mais de 10% das células neoplásicas e graduado conforme a intensidade da marcação em positivo duas cruzes (+ +) quando a intensidade era moderada e positivo três cruzes (+ + +) quando intensidade forte da coloração, como descrito em estudos prévios (SANNINO & SHOUSHA, 1994, SCHMITT *et al.*, 1995);
 - HER-2: considerado positivo quando houve marcação de membrana das células neoplásicas e graduado conforme o Manual de Interpretação do HerceptTest® (Dako). Quando houve coloração completa de membrana de intensidade fraca a moderada em mais de 10% das células neoplásicas foi adotado positivo duas cruzes (+ +). Quando a coloração da membrana era completa e intensa, normalmente homogênea, foi adotado positivo três cruzes (+ + +);
 - p63: considerado positivo quando houve marcação nuclear em mais de 10% das células neoplásicas e adotado positivo duas cruzes (+ +) quando até 50% das células neoplásicas
-

apresentavam marcação e positivo três cruces (+ + +) quando mais de 50% das células neoplásicas apresentavam marcação (RAMALHO *et al.*, 2006);

- CK5: considerado positivo quando houve marcação nuclear em mais de 10% das células neoplásicas e adotado positivo duas cruces (+ +) quando até 50% das células neoplásicas apresentavam marcação e positivo três cruces (+ + +) quando mais de 50% das células neoplásicas apresentavam marcação (RAMALHO *et al.*, 2006).

- Catepsina D: considerado positivo quando houve marcação citoplasmática em mais de 10% das células neoplásicas e graduado conforme a intensidade da marcação em positivo duas cruces (+ +) quando a intensidade era moderada e positivo três cruces (+ + +) quando houve intensa marcação (RAMIREZ-ORTEGA, *et al.*, 1997);

- Proteína S100A4: considerado positivo (+) quando houve marcação nuclear e citoplasmática em mais de 10% das células neoplásicas, independente da intensidade da marcação

Subtipos

Semelhante ao câncer de mama humano, os tumores mamários de cadelas são passíveis de classificação baseada nos marcadores preditivos utilizados na Medicina Humana. De acordo com a classificação proposta por Perou *et al.* (2000) e utilizado por Gama *et al.* (2008) em carcinomas mamários de cadelas, os tumores desse estudo foram classificados em quatro subtipos distintos: Luminal A (RE +/- HER-2 -), Luminal B (RE +/- HER-2 +), Basal (RE-/HER-2 - e P63 e/ou CK5 +) e super-expressão de HER-2 (RE -/ HER-2 +).

Análise estatística

O Teste Qui-quadrado foi utilizado para estudar a associação entre as categorias dos marcadores para receptores de estrógeno, HER-2, p63, CK5, Catepsina D e proteína S100A4, com os grupos carcinomas simples e complexo e também para avaliar a diferença de proporções entre os subtipos: Luminal A, Luminal B, basal e super-expressão do HER-2 com sua classificação histopatológica.

Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

Todos os cálculos foram analisados no programa SAS, versão 9.1 (SAS Institute, Cary, NC).

RESULTADOS

Classificação Histopatológica

Dos 66 tumores analisados, 21 (31,82%) foram do tipo carcinoma simples (Figura 2) e 45 (68,18%) carcinoma complexo (Figura 3).

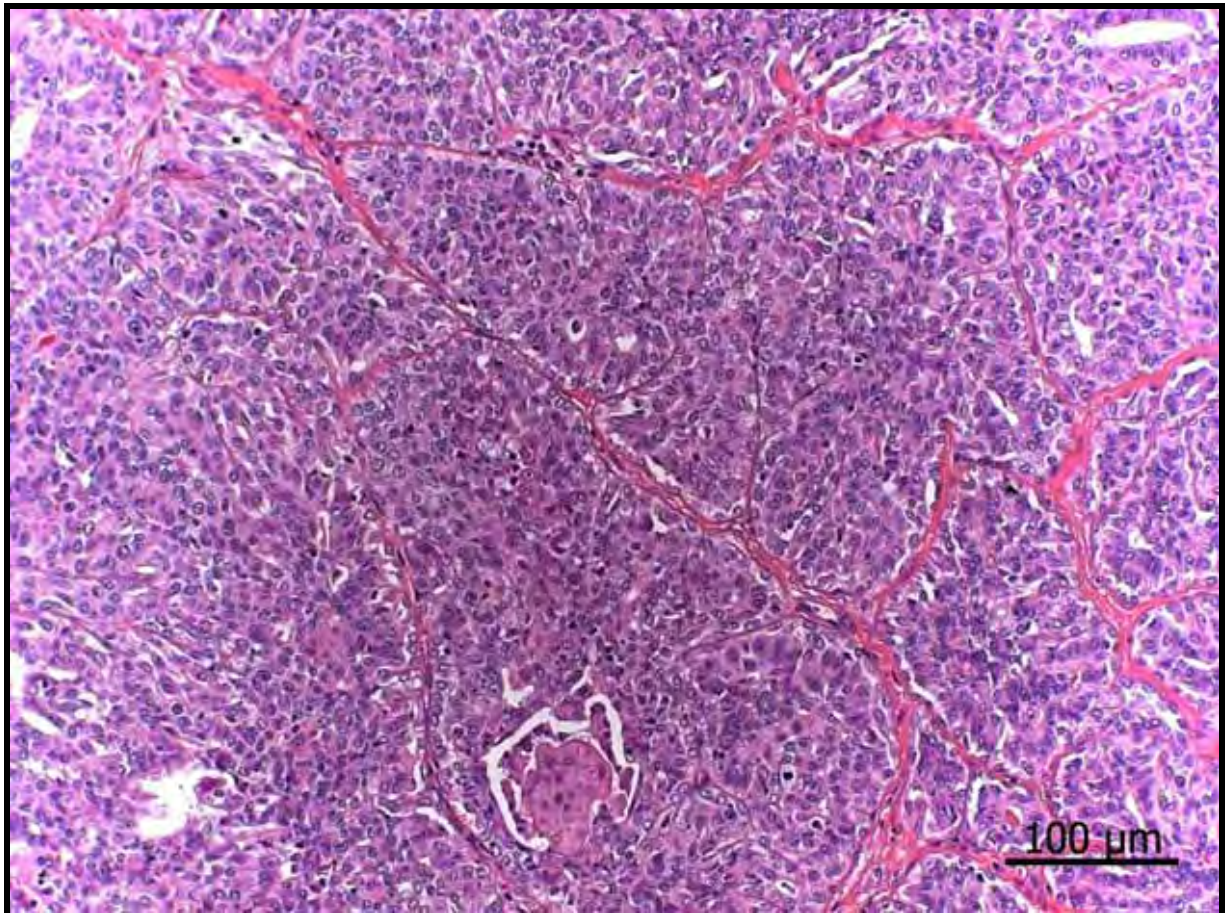


Figura 2 – Carcinoma Simples. Neoplasia composta por um tipo celular. Células epiteliais proliferadas, perda da arquitetura glandular e nucléolos evidentes. HE, 200X

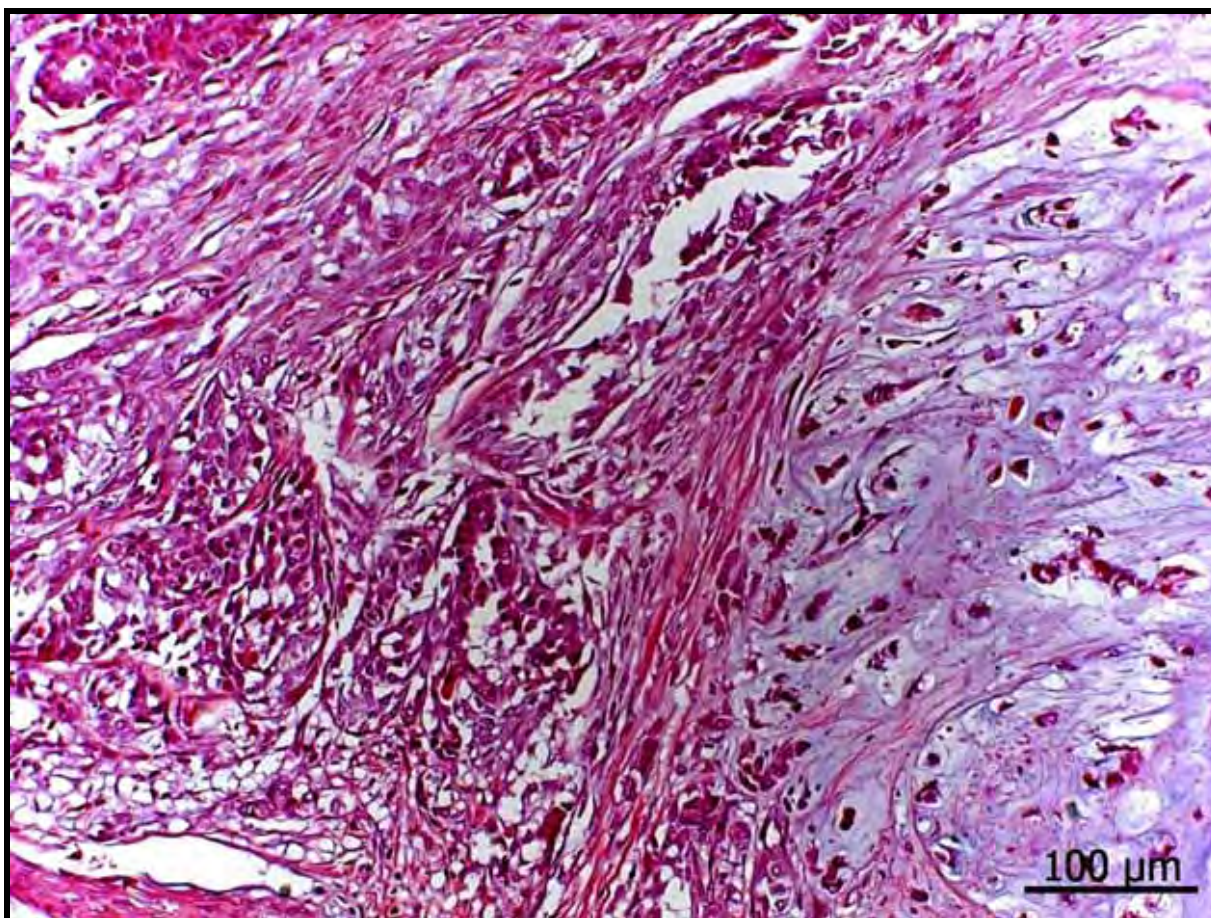


Figura 3 – Carcinoma complexo. Neoplasia composta por mais de um tipo celular. Células epiteliais proliferadas, com perda da arquitetura glandular e apresentando pleomorfismo. Células mioepiteliais alongadas, apresentando metaplasia cartilaginosa e produção de matriz. HE, 200X.

Marcação Imunoistoquímica

A técnica de *Tissue microarray* utilizada para a confecção das lâminas para realizar a imunopressão das proteínas de interesse nas células neoplásicas foi realizada com sucesso, ou seja, sem nenhuma interferência técnica.

Conforme demonstra a tabela 2, foi possível a identificação das proteínas RE, HER-2, p63, CK5, Catepsina D e proteína S100A4, nos carcinomas simples e nos carcinomas complexos. A imunopressão para RP foi negativa em todos os carcinomas (simples e complexos), entretanto todas as amostras controle foram positivas para RP, demonstrando que a técnica foi bem sucedida.

Tabela 2: Tabela de Contingência – Teste qui-quadrado (χ^2) para diferença de proporções.

Marcadores	Categorias	Carcinoma		Valor	
		Simplex	Complexo	p	χ^2
RE	0	20	33	0,01975*	5,434
	2	0	7	0,001341*	10,2857
	3	1	5	0,08326	3,0
HER-2	0	17	35	0,0003823*	12,9348
	2	4	6	1	0
	3	0	4	0,001176*	9,6457
P63**	0	14	34	0,0001052*	15,0417
	2	2	9	0,01052*	6,5455
	3	5	2	0,2850	1,1429
CK5	0	8	9	1	0
	2	4	4	1	0
	3	9	32	0,0001*	23,6098
Catepsina D	0	5	9	0,2568	1,2857
	2	5	12	0,03959*	4,2353
	3	11	24	0,004124*	8,2286
S100A4	0	16	35	0,0003645*	12,7059
	1	5	10	0,1441	2,1333

*Diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

**Teste qui-quadrado para associação entre os grupos e os marcadores ($p = 0,0263$ e $\chi^2 = 9,2340$)

Categorias: 0= negativo; 1= positivo +; 2= positivo ++ e 3= positivo +++.

Classificação em Subtipos

Os 66 tumores de mama analisados foram divididos em subtipos distintos baseado nos resultados da marcação imunoistoquímica conforme tabela 3. Para o subtipo Luminal A, 24 (36,36%) tumores (figura 4). Seis (9,09%) foram classificados em Luminal B (figura 5). Para o subtipo Basal (figura 6), 25 tumores (37,88%) e oito (12,12%) foram classificados em Super-expressão de HER-2 (figura 7). Três tumores (4,54%) ficaram sem classificação definida uma vez que não se encaixaram nos quatro subtipos propostos.

Para os marcadores catepsina D (figura 8) e proteína S100A4 (figura 9) foram positivos em 52 (78,79%) e 15 (22,73%) tumores, respectivamente. A tabela 4 mostra a imunoeexpressão desses marcadores nos diferentes subtipos.

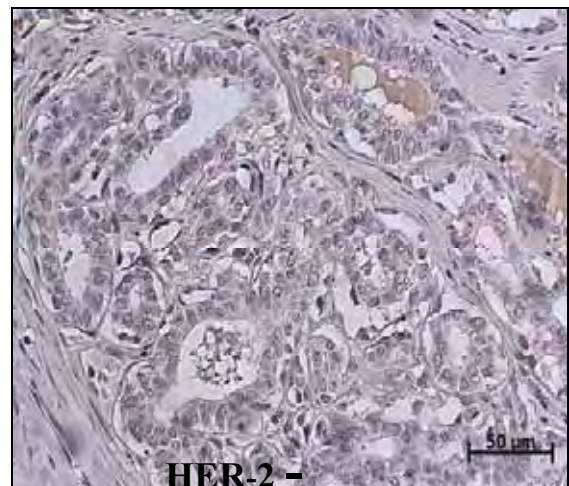
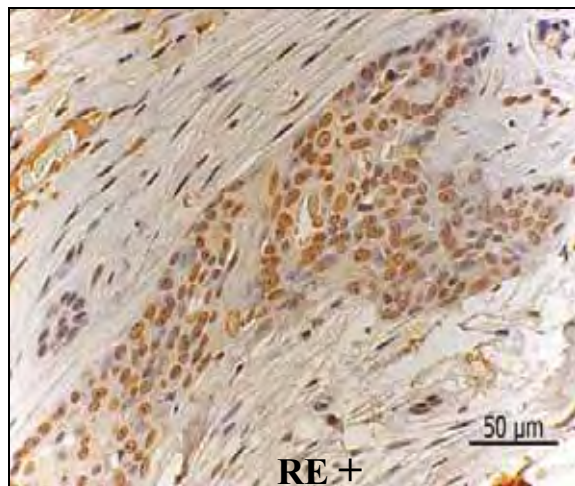
Tabela 3: Teste qui-quadrado (χ^2) para diferença de proporções

Carcinoma	Luminal A	Luminal B	Basal	Super-expressão do HER-2	Sem classificação	Total
Simplex	6	1	9	3	2	21
Complexo	18	5	16	5	1	45
Valor P	0,001496*	0,08326	0,08969	0,6171	-	-
χ^2	10,833	3,0	2,88	0,25	-	-

*Diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Tabela 4: Imunoexpressão da Catepsina D e proteína S100A4 nos diferentes subtipos de carcinoma de mama em cadelas.

Marcadores	Luminal A	Luminal B	Basal	Super-expressão HER-2
Catepsina D	20 (83,33%)	6 (100%)	23 (92%)	8 (100%)
Proteína S100A4	5 (20,83%)	2 (33,33%)	7 (28%)	1 (12,5%)

**Figura 4.** Carcinoma de mama em cadela, classificado em Subtipo Luminal A (RE +/ HER-2 -).400X.

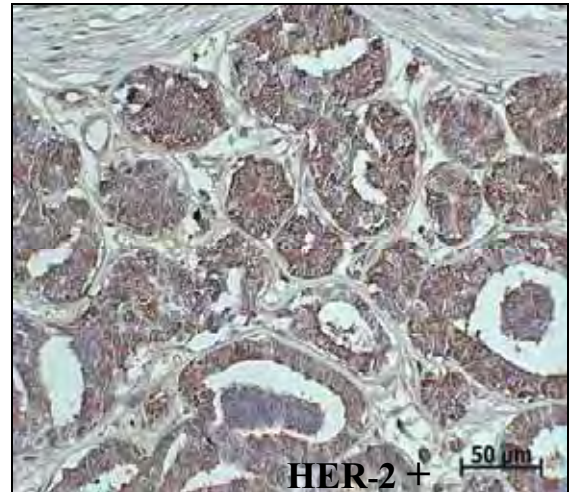
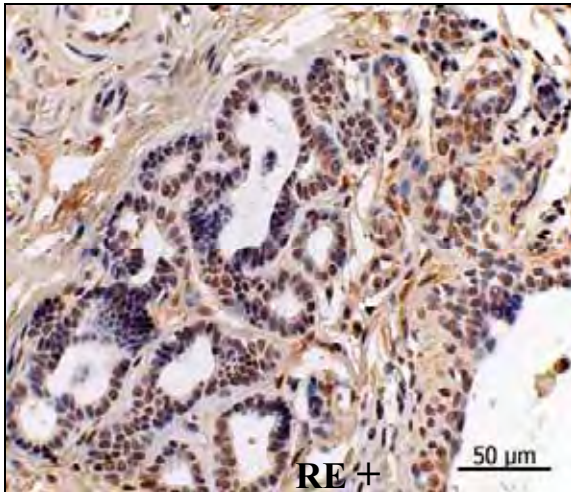


Figura 5. Carcinoma de mama em cadela, classificado em Subtipo Luminal B (RE +/ HER-2 +). 400X.

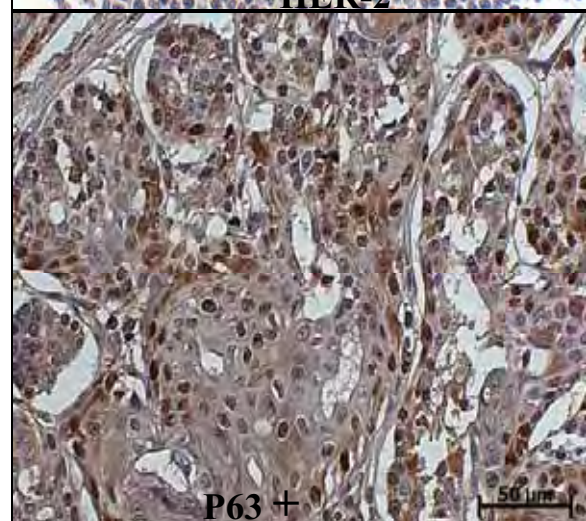
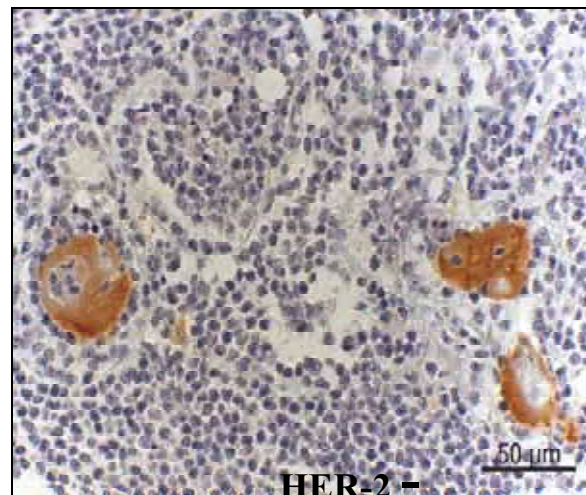
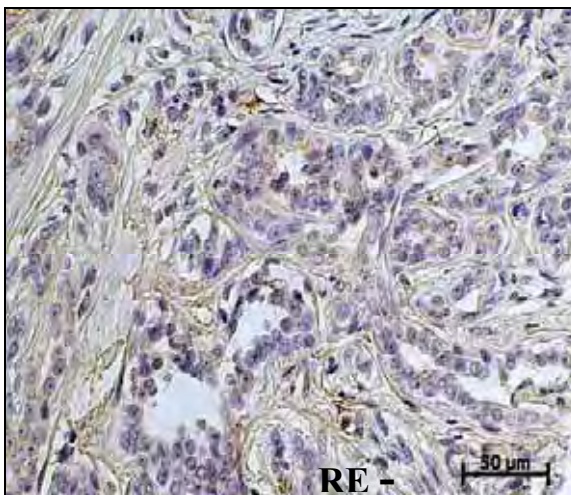


Figura 6. Carcinoma de mama em cadela, classificado em Subtipo Basal (RE -/ HER-2 -/ p63 e/ou CK5 +). 400X.

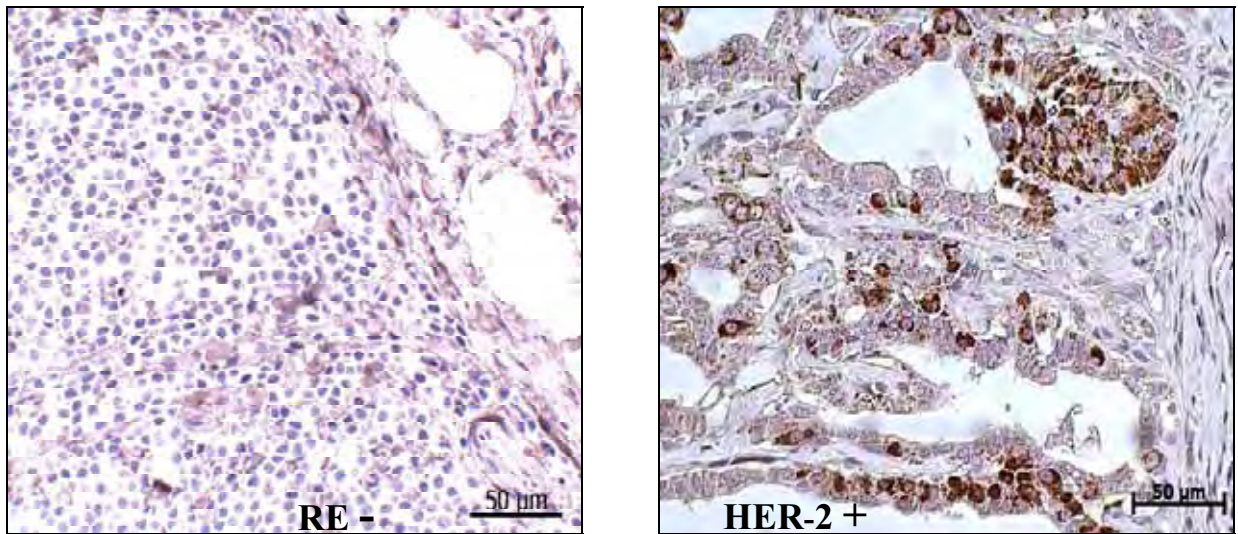


Figura 7. Carcinoma de mama em cadela, classificado em Subtipo Super-expressão do HER2 (RE - / HER-2 +). 400X.

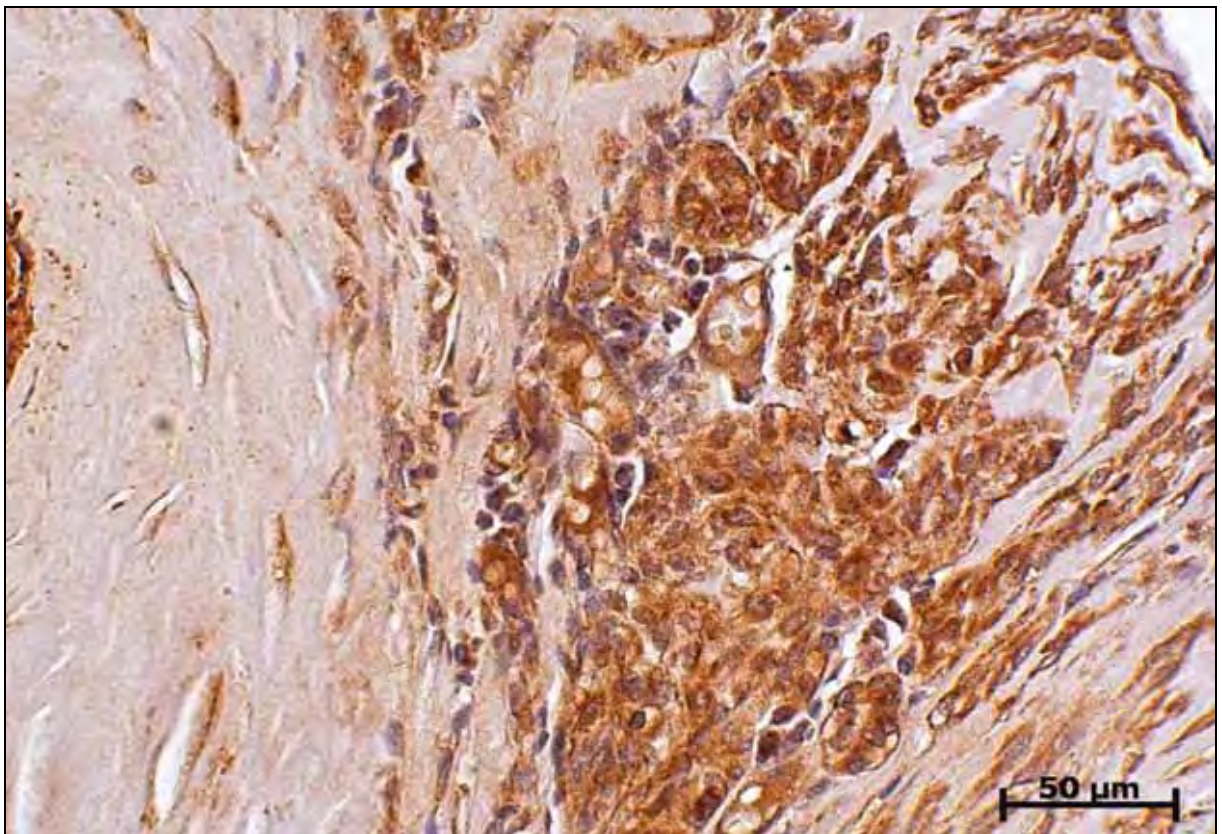


Figura 8. Marcação citoplasmática da Catepsina D em carcinoma de mama em cadela. 400X.

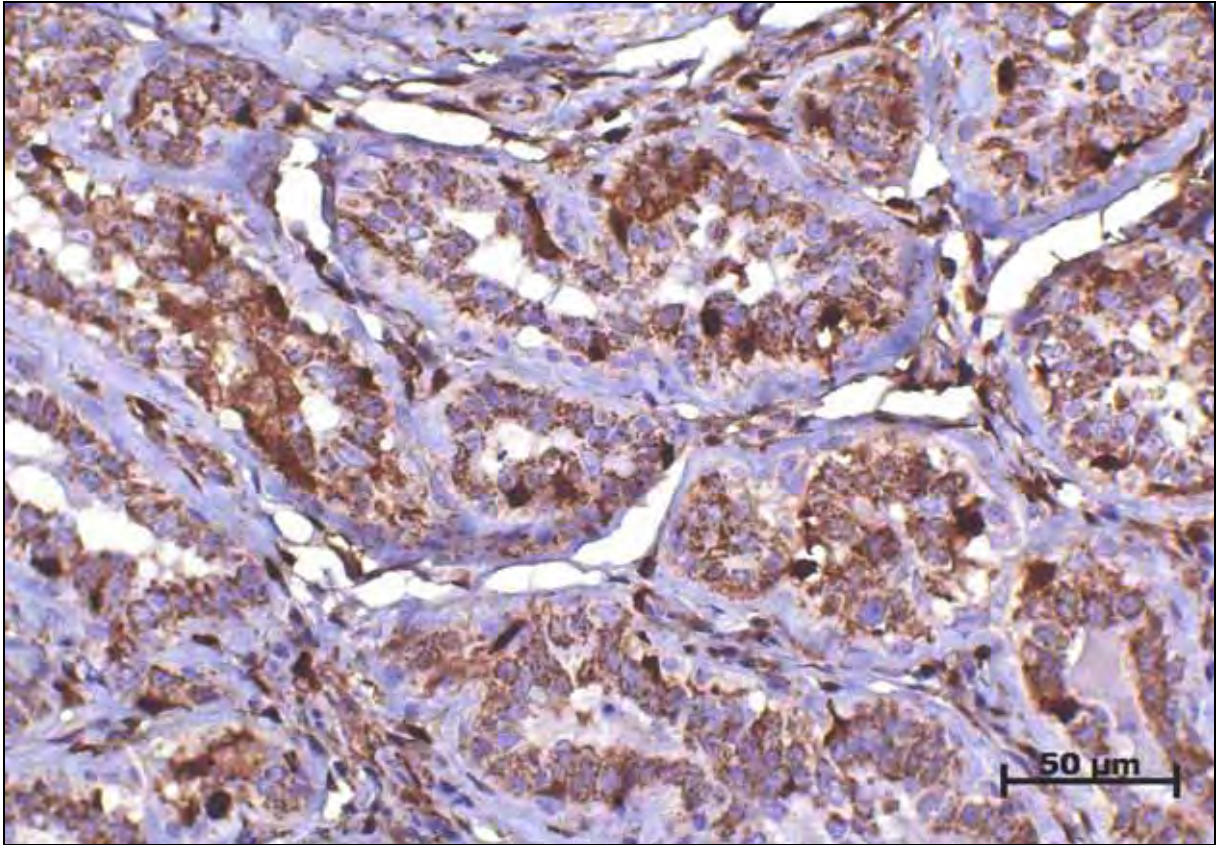


Figura 9. Marcação nuclear e citoplasmática da S100A4 em carcinoma de mama em cadela. 400X.

DISCUSSÃO

A escassez de estudos correlacionando a imunoeexpressão de proteínas com a expressão morfológica é evidente na Medicina Veterinária. O predomínio de diagnóstico de carcinoma complexo comparado com o de carcinoma simples está de acordo com a literatura (HATAKA, 2004). A caracterização imunohistoquímica da expressão de proteínas é de grande auxílio para a avaliação do prognóstico da neoplasia, pois evidencia células que nem sempre são identificadas na histopatologia convencional.

Neoplasias com positividade para receptores de estrogênio são consideradas de bom prognóstico na Medicina Humana, principalmente por sua resposta à terapia com medicamentos anti-hormonais (SILVA *et al.*, 2004). Em Medicina Veterinária ainda não há um consenso a esse respeito (SILVA *et al.*, 2004). Os resultados mostram que a positividade para RE foi maior nos carcinomas complexos do que nos carcinomas simples, corroborando com a literatura (DE LAS MULAS *et al.*, 2004), o que pode sugerir que os carcinomas complexos apresentam melhor prognóstico do que o carcinoma simples.

Em Medicina Humana estima-se que cerca de uma em cada cinco pacientes com câncer de mama metastático é HER-2 positiva e pesquisas recentes sugerem que essas pacientes são as que, provavelmente, terão uma forma mais agressiva de câncer de mama (TSUDA, 2006). Em Medicina Veterinária existem poucos estudos relacionando positividade para HER-2 e neoplasia mamária. Contudo, Dutra *et al.* (2004) verificaram a positividade em tumores de mama malignos de cadelas e afirmaram que essa imunoeexpressão pode caracterizar um importante papel na carcinogênese do tumor mamário, uma vez que em humanos já está estabelecido que o gene c-erbB-2 (responsável pela produção da proteína HER-2) relaciona-se com a iniciação do câncer de mama e tem sido utilizado como alvo de terapia genética. No presente estudo não houve diferença entre a positividade para os

carcinomas simples e complexos, cuja expressão foi de aproximadamente 20% para os dois tipos de neoplasia.

A p63 é útil para caracterizar as células mioepiteliais da mama e assim tentar elucidar a histogênese do tumor (BERTAGNOLLI, 2006), já que é considerado um possível marcador para as células de reserva (SIGNORETTI *et al.*, 2000; RIBEIRO-SILVA *et al.*, 2003). Os resultados obtidos foram interessantes uma vez que em mais de 40% dos carcinomas simples houve positividade para a p63, demonstrando uma população de células mioepiteliais neoplásicas não vistas na histopatologia convencional, em lâminas coradas pelo HE.

Nos carcinomas complexos houve positividade para CK5 em 90% dos casos, enquanto que nos carcinomas simples, 80%. Os achados estão de acordo com a literatura, que relata positividade para células malignas com prognóstico desfavorável (ZUCCARI *et al.*, 2004).

Assim como Gama *et al.* (2008), que utilizou pela primeira vez essa nova classificação dos tumores de mama da mulher nos carcinomas mamários de cadelas, baseado nos resultados dos marcadores pudemos classificar os tumores de mama de cadelas nos diferentes subtipos descritos na literatura por Perou *et al.* (2000).

Encontramos diferença estatística no subtipo Luminal A, mais frequente associado com os carcinomas complexos, corroborando com a literatura (GAMA *et al.*, 2008), que nos remete a um tumor menos agressivo, com chances de responder bem ao tratamento com terapia hormonal.

Apesar de não ter diferença significativa, a maioria dos tumores (37,88%) foi classificada como Basal. Vários estudos têm demonstrado que os carcinomas da mama humana subtipo basal apresentam características moleculares, histológicas e de comportamento tumoral que lhe conferem prognóstico desfavorável (SILVA *et al.*, 2008), principalmente por não possuírem alvos terapêuticos conhecidos. Essa maior frequência do

subtipo basal nos carcinomas de mama da cadela pode eleger esse animal como modelo experimental para o subtipo basal em mulheres.

Matos *et al.* (2005) e Livasy *et al.* (2006) demonstraram que é possível reconhecer os subtipos de carcinomas da mama através do fenótipo imunoistoquímico apenas com a utilização de dois anticorpos, RE e HER-2, que definem os subtipos principais: luminal (RE+/HER-2-/ +), o que super-expressa o HER-2 (RE-/HER-2+) e o basal (RE-/HER-2-), embora a utilização de marcadores basais/mioepiteliais permite uma caracterização mais completa do fenótipo basal. Em Medicina Veterinária há uma dependência do poder aquisitivo dos proprietários para o processamento das amostras. Por isso a utilização de marcadores que possam dar informações mais completa é uma alternativa que pode agradar a todos os proprietários, além de melhorar o diagnóstico, dar indicação do prognóstico e da terapia adequada a cada paciente.

A imunomarcção da Catepsina D foi bem característica e intensa nas células neoplásicas, principalmente nas células epiteliais. O papel desse marcador não está bem definido, ainda há estudos controversos em medicina humana (RAMIREZ-ORTEGA, *et al.*, 1997), entretanto os resultados observados no presente estudo nos faz inferir que essa marcação deva ser considerada na predição do prognóstico desses tumores, uma vez que até os êmbolos neoplásicos observados dentro de vasos linfáticos foram fortemente positivos para a Catepsina D.

A proteína S100A4 foi útil para também caracterizar as células basais/mioepiteliais. Apesar dos relatos na literatura citarem a utilização desse marcador em cultivos celulares (LI e BRESNICK, 2006), a indicação da Abcam (fabricante do anticorpo) também é para se utilizar esse anticorpo em imunoistoquímica, para predizer o potencial metastático das células a partir de sua motilidade. Ismail *et al.* (2008) concluíram que a diferença na expressão da

proteína S100A4 sugere que ela pode ser útil como um marcador independente do câncer de mama pois em estágios avançados ela parece estar desregulada.

Não se tem conhecimento na literatura especializada no assunto do uso desses dois marcadores em tumores de mama de cadelas, do mesmo modo que os poucos relatos encontrados são direcionados aos tecidos humanos.

CONCLUSÃO

Estes resultados sugerem que, como na classificação de carcinomas de mama humanos, existe a necessidade de re-avaliar a classificação atual destes tumores de cadelas, com a possibilidade de que isso leve a tratamentos mais específicos com a descoberta de alvos terapêuticos eficazes e esclarecimento dos prognósticos. Contudo, é necessário mais pesquisas para dar consistência aos resultados da Catapsina D e da proteína S100A4 em tumores mamários de cadelas.

REFERÊNCIAS

BECKMANN, M.W., NIEDERACHER, D., SCHNÜRCH, H.G., GUSTERSON, B.A., BENDER, H.G. Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. *J Mol Med*, 1997, 75:429–439

BERTAGNOLLI, A. C. Expressão de p63 e p53 em tumores mamários mistos de cadelas. [dissertação]. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria; 2006.

BÖCKER, W.; MOLL, R.; POREMBA, C. Common adult stem cells in the human breast give rise to glandular and myoepithelial cell lineages: a new cell biological concept. *Lab Invest*, 2002a; 82: 737-745.

BÖCKER, W.; BIER, B.; LUDWIG, A. Benign proliferative lesions and *in situ* carcinoma of the breast: new immunohistological findings and their biological implications. *Eur J Cancer Prev*, 1993; 2: 41–49.

CASSALI, G.D. Estudo morfológico, imunoistoquímico e citométrico de tumores mamários da cadela – aspectos comparativos com neoplasias da mama humana. [tese]. Belo Horizonte: Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais; 2000.

DE LAS MULAS, J. M., ORDÁS, J., MILLÁN, Y., FERNÁNDEZ-SORIA, V., RAMÓN, Y. CAJAL, S. Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas: an immunohistochemical and chromogenic *in situ* hybridization study. *Breast Cancer Res Treat*, 2003 80:363–367

DE LAS MULAS, J.M.; ORDÁS, J.; MILLÁN, M.Y.; CHACÓN, F.; De LARA, M.; De LOS MONTEROS, A.E., *et al.*, A. Immunohistochemical expression of estrogen receptor β in normal and tumoral canine mammary glands. *Vet Pathol*, 2004; 41: 269-272.

DE LAS MULAS, J. M., MILLÁN, Y., DIOS, R. A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor α and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog. *Vet Pathol*, 2005, 42:200–212

DUTRA, A.P.; GRANJA, N.V.M.; SCHMITT, F.C.; CASSALI, G.D. c-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. *Braz J Med Biol Res.*, 2004; 37: 11.

HATAKA, A. Citologia aspirativa por agulha fina e histopatologia: valor e significado para diagnóstico e prognóstico do câncer de mama em cadelas. [tese] Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2004.

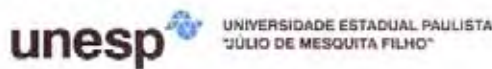
ISMAIL, N. I., KAUR, G., HASHIM, H., HASSAN, M. S. S100A4 overexpression proves to be independent marker for breast cancer progression. *Cancer Cell Internat* 2008, 8:12

LEE, C.H., KIM, W.H., LIM, J.H., KANG, M.S., KIM, D.Y., KWEON, O.K. Mutation and overexpression of p53 as a prognostic factor in canine mammary tumors. *J Vet Sci*, 2004 5:63–69

-
- LIVASY, C.A., KARACA, G., NANDA, R. et al: Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol* 2006;19:264-271
- MATOS, A.J., LOPES, C.C., FAUSTINO, A.M., CARVALHEIRA, J.G., DOS SANTOS, M.S., RUTTEMAN, G.R., GARTNER, F. MIB-1 labelling indices according to clinico-pathological variables in canine mammary tumours: a multivariate study. *Anticancer Res*, 2006 26:1821–1826
- MATOS, I.; DUFLOTH, R.; ALVARENGA, M.; ZEFERINO, L.C.; SCHMITT, F. p63, cytokeratin 5, and P-cadherin: three molecular markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas. *Virchows Arch*. 2005; 447: n 4, 688-694.
- MISDORP, W. Tumors of the mammary gland. In: MEUTEN, D.J. Tumors in domestic animals, 4.ed. Ames: Iowa State Press, 2002. p. 575-606.
- MISDORP, W.; ELSE, R.W.; HELLMÉN, E.; LIPSCOMB, T.P.; Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. 2.ed. v.7. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1999.
- NERURKAR, V.R.; CHITALE, A.R.; JALNAPURKAR, B.V.; NAIK, S.N.; LALITHA, V.S. Comparative pathology of canine mammary tumors. *J Comp Pathol*, 1989; 101: 389-397.
- PELED R, CARMIL D, SIBONI-SAMOCHA O, SHOHAM-VARDI I. Breast cancer, psychological distress and life events among young women. *BMC Cancer*. 2008; 8:245.
- PEROU, C.M.; SORLIE, T.; EISEN, M.B. Molecular portraits of human breast tumors. *Nature*, 2000; 406:747–752.
- PHILIBERT, J.C.; SNYDER, P.W.; GLICKMAN, N. ; GLICKMAN, L.T.; KNAPP, D.W.; WATERS, D.J. Influence of host factors on survival in dogs with malignant mammary gland tumors. *J Vet Int Med*, 2003; 17: 102-106.
- RAMALHO, L. N. Z., RIBEIRO-SILVA, A., CASSALI, G. D., ZUCOLOTO, S. The Expression of p63 and Cytokeratin 5 in Mixed Tumors of the Canine Mammary Gland Provides New Insights into the Histogenesis of These Neoplasms. *Vet Pathol*, 2006 43:424–429.
- RAMIREZ-ORTEGA, M. C. FRIAS-MENDIVIL, M. DELGADO-CHAVEZ, R. MENESE-GARCIA, A. CARRILLO-HERNANDEZ, J. F. RAMOREZ-UGALDE, M. T. ZEICHNER-GANCZ, I. Expresion de catepsina D em carcinoma mamario y SUS correlaciones clinicas e histopatológicas. *Ver Invest Clin*. 1997, Sep-Oct; 49(5):361-8.
- RIBEIRO-SILVA, A.; RAMALHO, L.Z.; GARCIA, S.B.; ZUCOLOTO, S. The relationship between p63 and p53 expression in normal and neoplastic breast tissue. *Arch Pathol Lab Med* 127: 2003; 336-340.
- SANNINO, P. & SHOUSHA, S. Demonstration of oestrogen receptors in paraffin wax sections of breast carcinoma using the monoclonal antibody 1D5 and microwave oven processing. *J. Clin. Pathol.*, 1994, 47(1): 90-2.
-

-
- SCHMITT, F.C.; BENTO, M.J. & AMENDOEIRA, I. Estimation of estrogen receptor content in fine-needle aspirates from breast cancer using the monoclonal antibody 1D5 and microwave oven processing: correlation with paraffin embedded and frozen sections determinations. *Diagn. Cytopathol.*, 1995, 13(4): 347-51.
- SIGNORETTI, S.; WALTREGNY, D.; DILKS, J.; ISAAC, B.; LIN, D.; GARRAWAY, L.; YANG, A.; MONTIRONI, R.; MCKEON, F.; LODA, M. p63 is a prostate basal cell marker and is required for prostate development. *Am J Pathol*, 2000; 157: 1764-1775.
- SILVA F, CARVALHO S, MILANEZI F, SCHMITT F, Carcinoma da mama tipo basal, *Acta Med Port.* 2008; 21(4):387-392
- SILVA, A. E.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G.D. Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. *Ciência Rural*, 2004; 34(2): 625.
- SORLIE, T.; PEROU, C.M.; TIBSHIRANI, R.; AAS, T.; GEISLER, S.; JOHNSEN, H., *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001; 98:10859–10874.
- SORLIE, T.; TIBSHIRANI, R.; PARKER, J.; HASTIE, T.; MARRON, J.S.; NOBEL, A., *et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003; 100:8418–8423.
- TSUDA, H. HER-2 (c-erbB-2) Test Update: Present Status and Problems. *Breast Cancer*, 2006; 13(3): 236-248.
- ZAIDAN DAGLI, M.L. The search for suitable prognostic markers for canine mammary tumors: a promising outlook. *Vet J*, 2008, 177:3–5.
- ZUCCARI, D.A.P. C.; PAVAM, M.V.; CORDEIRO, J. A.; SANTANA, A. E. A imunopressão das citoqueratinas como marcadores diagnósticos e prognósticos nas neoplasias mamárias caninas. *RPCV*, 2004; 99 (551): 173-178.
-

Anexo 1 - Parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu.



ATESTADO

Atestamos para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa **Imunoexpressão de receptores de Estrógeno e Progesterona, HER-2, P63, CK5, Catepsina D e proteína S100A4 em carcinoma espontâneo de mama de cadela**”, Protocolo nº 233/2008-CEEA, **Fernanda Carmello Figueiroa** aluna de Pós-graduação **Fernanda Carmello Figueiroa**, da Faculdade de Medicina da UNESP, campus de Botucatu está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foi aprovado *Ad referendum* pela Câmara de Ética em Experimentação Animal.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em 9 de dezembro de 2008.


Prof. Ass. Dr. Luiz Henrique de Araujo Machado
Presidente da CEEA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu



FMVZ/UNESP – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Seção Técnica Acadêmica
Distrito de Rubião Jr., s/n – Botucatu/SP – 18618-000
☎/fax: 14-3811-6105 – ✉ sta@fmvz.unesp.br – 🌐 www.fmvz.unesp.br



Anexo 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.**FMVZ-UNESP****FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA – BOTUCATU
SERVIÇO DE PATOLOGIA VETERINÁRIA**CEP 18.618-970 – Cx Postal 585 – Botucatu - SP - Rubião Jr. – FONE/ FAX (14) 38116293

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Informo que estou de acordo, consciente e perfeitamente esclarecido que será realizada coleta do tumor de mama da cadela: _____, idade: _____, peso: _____, raça: _____, pelagem: _____ RG/FMVZ-Unesp-Botucatu: _____, de minha propriedade, para a realização de exame histopatológico e imunoistoquímico para fins de pesquisa no Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu e posteriormente os resultados serão publicados em revistas especializadas nesse assunto.

Proprietário (a): _____

RG: _____ CPF: _____

Assinatura: _____

Botucatu, ____ de _____ de 20__.

